

Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie

8. Jahrgang

Juli 1970

Heft 4 (S. 321—448)

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 321—328, Juli 1970

Physikalische Grundlagen der Mikroskop-Photometrie

Von R. HERRMANN¹⁾

Abteilung für Medizinische Physik, Universitäts-Hautklinik, Gießen

(Eingegangen am 29. März 1970)

Die Messung der Absorptionen in mikroskopischen Präparaten, wie z. B. in einzelnen Zellen, in einzelnen Zellbestandteilen oder in kleinen Tröpfchen bei mikrochemischen Arbeiten bietet dem klinischen Chemiker oder Biochemiker zusätzliche Informationen, die über das weit hinausgehen, was man mit mikrochemischen Methoden leisten kann. Es werden die physikalischen Grundlagen dieses mikroskopischen Absorptionsverfahrens dargestellt, wobei insbesondere auf die Unterschiede zur üblichen makroskopischen Absorptions-Photometrie in Küvetten eingegangen wird. Auf die weiteren Entwicklungsmöglichkeiten dieses Verfahrens wird am Schluß kurz eingegangen.

The physical basis of microscopic photometry

The measurement of absorption in microscopic preparations, e. g., single cells, single cell components or in small drops in microchemical work provides the clinical chemist or biochemist with additional information, which surpasses that obtained with microchemical methods. The physical basis of this microscopic absorption method is presented and particular attention is paid to the differences between this and the usual macroscopic absorption photometry in cuvettes. Finally, further possibilities for the development of this method are briefly discussed.

Einleitung

In der allgemeinsten Bedeutung des Wortes versteht man unter Photometrie die Messung von Strahlungen. Wir wollen uns hier auf Strahlungen aus dem sichtbaren und aus dem ultravioletten Spektralbereich beschränken. Selbst bei diesem enger gefaßten Thema gibt es wieder eine ganze Reihe von Möglichkeiten, wie man aus der Veränderung der einfallenden Strahlung durch Wechselwirkungen mit dem zu untersuchenden Stoff zu chemischen Informationen über den zu untersuchenden Stoff selbst gelangt. Wir erinnern daran, daß es Absorptionsmethoden, daß es nephelometrische Methoden, fluorimetrische Methoden, interferometrische Methoden usw. gibt. All diese Verfahren sind, mit nur wenigen Einschränkungen, auch auf mikroskopisch kleine Objekte übertragbar. In solchen Fällen wird man sich zur Untersuchung so kleiner Objekte zusätzlich eines Mikroskopes bedienen. In diesem Sinne sprechen wir von Mikroskop-Photometrie. Wegen der Vielzahl der Möglichkeiten wollen wir uns bei der Besprechung der Grundlagen auf die Vorgänge bei der Absorption im Mikromaßstab beschränken.

Der Vorteil der Mikroskop-Photometrie besteht darin, daß man zu konkreten Aussagen hinsichtlich der chemi-

schen Zusammensetzung einzelner Tropfen, einzelner Zellen, einzelner Organellen in Zellen usw. kommen kann, während die üblichen chemischen Verfahren nur Mittelwerte über die summierten Massen von vielen differenten Partikeln mit verschiedener Vorgeschichte, verschiedenem Alter, verschiedener Morphe usw. liefern können.

Der erste, der diesen so verstandenen speziellen mikroskopphotometrischen Absorptionsverfahren wesentliche Impulse gab, war T. CASPERSSON 1936 (1, 2).

Physikalische Grundlagen

Die mathematische Beschreibung des üblicherweise ablaufenden Absorptionsvorganges erfolgt mit Hilfe des sogenannten BOUGUER-LAMBERT-BEERSchen Gesetzes:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d,$$
$$\text{mit } E = \log \frac{I_0}{I}.$$

Darin bedeutet E_{λ} die gemessene Extinktion, ε_{λ} eine von der Wellenlänge abhängige Stoffkonstante, c die gesuchte Konzentration und d die Schichtdicke der Küvette (3), I_0 die Intensität der einfallenden Strahlung, I die der infolge Absorption geschwächten Strahlung. Ich möchte ausdrücklich darauf hinweisen, daß dieses Gesetz kein allgemeingültiges Naturgesetz ist; es gilt nur in gewissen Grenzen, nämlich meist nur bei gerin-

¹⁾ Vortrag vor der Tagung „Biochemische Analytik 70“ in München am 29. 4. 1970.

gen Konzentrationen und konstant gehaltenem Milieu (Temperatur, pH usw.).

In Abbildung 1 ist im Prinzip der Absorptionsvorgang angedeutet. Zur Erfassung von Absorptionen in so kleinen Volumina muß man mit dem Meßstrahlenbündel I_0 durch ein Mikroskop hindurchgehen. Hierbei erfolgt die optische Aussonderung des tatsächlich benützten Bündels bzw. der Meßfläche meist erst in der reellen Bildebene des Mikroskop-Objektives. Die häufig be-

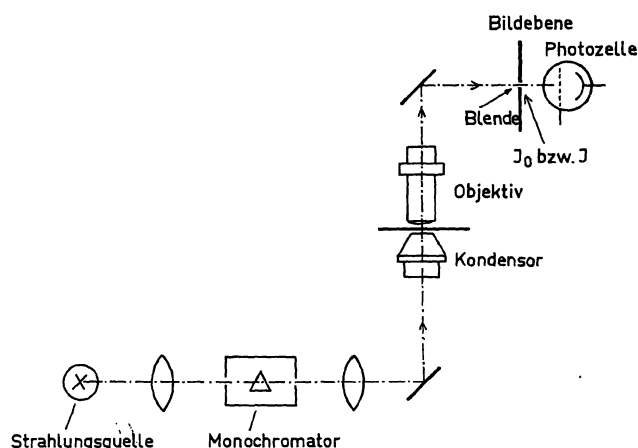


Abb. 1

Meßanordnung bei der Mikroskop-(Spektral-)Photometrie. Der für die Messung wirksame Meßstrahlenbündeldurchmesser mit der Fläche Δf im Präparat erscheint vergrößert in der Bildebene des Mikroskopes, meist dargestellt durch eine Blende. I_0 erscheint hinter der Blende, wenn man eine Leerstelle im Präparat einstellt. I erscheint entsprechend nach Einstellung z. B. auf eine absorbierende Zelle

nützten Bündeldurchmesser bzw. Meßflächen Δf liegen, bezogen auf das Präparat, bei $0,5 \mu\text{m}^2$. Die Absorptionsvorgänge im Mikromaßstab lassen sich prinzipiell mit dem gleichen mathematischen Formalismus wie im Makrobereich beschreiben, d. h. mit dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz. Allerdings kommen im Mikromaßstab einige Besonderheiten hinzu. Die wichtigsten davon will ich im folgenden andeuten.

Abgesehen von diesen quantitativen Beziehungen kann man naturgemäß die wellenlängenabhängigen Absorptionen, nur qualitativ betrachtet, zur Identifizierung von Stoffen verwenden. Das gilt sowohl für den Makro- als auch für den Mikro-Bereich.

Unbekannte Schichtdicke

Da bei Küvetten die Schichtdicke „d“ bekannt ist, kann man aus dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz im Makrobereich durch Messung der Extinktion E die gesuchte Konzentration „c“ bestimmen. Bei der Übertragung dieses Gedankens auf den Mikrobereich ergibt sich aber die prinzipielle Schwierigkeit, daß die Schichtdicke „d“ meist nicht bekannt ist. Sie wäre nur mit zusätzlichem Aufwand und zusätzlichen Fehlern zu ermitteln. Dazu kommt, daß die Schichtdicke an Zellen — übrigens auch an Tropfen — über das ganze Objekt hinweg örtlich verschieden ist, ganz im Gegensatz zu Küvetten. Man hat bei der Übertragung des Makroverfahrens auf den Mikrobereich also im Grunde genommen auch nur einen Meßwert, nämlich die Extinktion E , aber zwei Unbekannte, nämlich c und d , also eine Unbekannte

mehr als vorher. Dabei ist d noch nicht einmal gut definierbar. Diese Schwierigkeit läßt sich dadurch aus dem Weg schaffen, daß man durch eine geeignete mathematische Umformung das LAMBERT-BEERSche Gesetz in eine solche Form bringt, in der nicht mehr die Konzentration, d. h. die Masse pro Volumeneinheit, vorkommt, sondern vielmehr die sogenannte Flächenbelegung. Man projiziert gewissermaßen alle Massen auf die Unterlage, z. B. auf die Oberfläche des Objektträgers. Man bestimmt nunmehr die projizierten Massen pro Flächenelement, bzw. man integriert dies gleich über die ganze projizierte Zellfläche bzw. den projizierten ganzen Tropfen. Diese Summation bzw. Integration aller Massenelemente führt letzten Endes auf die an der betreffenden Stelle des Spektrums absorbierende Gesamtmasse M der Zelle bzw. des Tropfens. In der Mikroskop-Photometrie darf man also nicht nach der Konzentration c fragen, sondern man muß Massen M bestimmen. Das Ergebnis dieser Umformung (4, 5) ist:

$$\sum E_{\lambda} \cdot \Delta f = \epsilon_{\lambda} \cdot M,$$

mit Δf = Flächenelement.

Wahl der Meßfläche bzw. des Bündeldurchmessers

Aus der umgeformten Gleichung kann man direkt eine Meßvorschrift ablesen, d. h. hier im Mikrobereich mit variabler Schichtdicke und inhomogener Stoffverteilung dürfen wir nicht so ohne weiteres eine integrierende Absorptionsmessung über ein größeres Volumen, z. B. eine durchstrahlte Zelle oder einen Tropfen vornehmen und daraus die mittlere Extinktion bilden — was bei Küvetten mit definierter Schichtdicke und homogenem Inhalt durchaus erlaubt ist —, sondern wir müssen nacheinander Flächenelement für Flächenelement messen und die jeweils erhaltenen Extinktionen bzw. die zugehörigen Massen aufsummieren bzw. aufintegrieren. Die Notwendigkeit für dieses unterschiedliche Vorgehen ergibt sich daraus, daß Summation bzw. Mittelwertbildung einerseits und Logarithmierung für die Extinktionsbildung andererseits keine vertauschbaren Operationen sind.

Die Größe der Meßfläche bzw. des jeweils benützten Strahlenbündeldurchmessers Δf bei solchen Messungen wird durch folgende Forderungen festgelegt: Der Meßbündeldurchmesser muß einerseits so klein sein, daß innerhalb des zugehörigen Flächenelementes bzw. des darüber zu denkenden Volumenelementes der Zelle bzw. des Tropfens keine wesentlichen Dickenunterschiede vorkommen (vernachlässigbarer „distributional error“), daß aber andererseits dieses Bündel so groß gewählt werden muß, daß man oberhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskopes bleibt und daß man genügend hohe noch leidlich genau meßbare Intensitäten (genauer Strahlungsleistungen) durch dieses Bündel hindurchbekommt. Man beachte, daß bei zu kleinen Strahlungsleistungen der Anteil des Elektronenrauschens am Signal zu groß wird, d. h. die Anzeigen am Meßinstrument unruhig und damit ungenau werden (6, 7).

Die Abrasterung des Objektes

Aus dem umgeformten LAMBERT-BEERSchen Gesetz ergibt sich beispielsweise die Meßvorschrift, das mikroskopische Objekt — z. B. eine Zelle oder einen Tropfen — mit einem monochromatischen Strahlenbündel geringen Bündeldurchmessers von z. B. $0,5 \mu\text{m}^2$ Fläche ($\Delta f = 0,5 \mu\text{m}^2$) Flächenelement einzeln nacheinander hinsichtlich der jeweils erzielten Teil-extinktionen zu messen und diese Teil-extinktionen aufzusummieren und mit der abgerasterten Fläche zu multiplizieren und anschließend dann durch ϵ_λ , den stoffspezifischen Extinktionskoeffizienten, zu teilen. Das Ergebnis dieser Meß- und Rechenoperationen ergibt gemäß dem umgeformten LAMBERT-BEERSchen Gesetz dann die gesuchte Masse des absorbierenden Stoffes im mikroskopischen Objekt, z. B. den Nucleinsäuregehalt in g in einem menschlichen Spermium. Es gibt Geräte, die diese eben angedeuteten Meß- und die anschließenden Rechenoperationen vollautomatisch erledigen. Solche Mengen an Nucleinsäure liegen im genannten Beispiel häufig in der Größenordnung²⁾ von einigen pg (8, 9, 10), während die Nachweisgrenze der Methode bei guten Geräten bei 10–100 fg liegt (9). — Das erwähnte Abrastern ist, wie schon ausgeführt, deshalb notwendig, weil das mikroskopische Objekt keine gleichbleibende Schichtdicke hat, wie z. B. die Lösung in einer Küvette bei Anwendung einer Makromethode. Das eben erwähnte Abrastern des Objektes kann nun in verschiedener Weise erfolgen: Die Abbildung 2 zeigt einige Beispiele dafür. Literatur dazu siehe l. c. (11). Ich möchte darauf hinweisen, daß bei den Zeilenmeßverfahren Meßflächen, die weit außerhalb des mikroskopischen Objektes liegen, keine Meßfehler verursachen, sofern die Umgebung des Objektes frei ist, d. h. Extinktion 0 zeigt. Solche Meßverfahren werden also vorzugsweise bei isoliert liegenden Zellen bzw. bei frei hängenden Tropfen in der Mikroanalytik usw. verwandt. Bei Messungen an Zellen in Zellverbänden, wie z. B.

in einem histologischen Schnitt, ergeben sich zusätzliche Schwierigkeiten durch die Umgebung der interessierenden Zelle. Diese kann man bis zu einem gewissen Grade dadurch beheben, daß man den abzurasternden Bereich des Gesamtpräparates — z. B. die gerade zu messende Zelle — hinsichtlich ihrer Begrenzung in das Gerät hinein vorprogrammiert und dem Gerät gewissermaßen die Aufgabe stellt, nur diesen Bereich vollautomatisch abzurastern, jedoch nicht die Umgebung. Bei einfacheren Geräten ist das manuell möglich. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß selbst bei freiliegenden mikroskopischen Objekten Fehler dadurch entstehen können, daß die am Rande liegenden Anteile der Zelle, je nach dem gewählten Abraster- und Auswertverfahren mehr oder weniger stark mitgemessen werden. Einzelheiten dazu findet man in der Literatur (12).

Weiterhin wollen wir in diesem Zusammenhang erwähnen, daß es, abgesehen von der eben angedeuteten Abrastervariationsmöglichkeit, drei prinzipiell verschiedene Verfahren gibt, dieses Nacheinander-Messen der einzelnen Flächenelemente einer Zelle bzw. eines mikroskopischen Objektes zu bewerkstelligen:

1. Man läßt das Meßstrahlenbündel stehen und bewegt sprungweise bzw. kontinuierlich zeilenweise das mikroskopische Objekt nach einem der oben angedeuteten Abrasterverfahren (Abb. 3, a—c).
2. Man läßt das Objekt stehen und bewegt entsprechend das Strahlenbündel auf der Bildseite, z. B. mit Hilfe beweglicher Umlenkspiegel.
3. Man läßt wieder das Objekt stehen, bewegt aber das abrasternde Strahlenbündel auf der Beleuchtungsseite, z. B. mit Hilfe des wandernden Lichtpunktes einer Fernsehröhre (flying spot).

Das oben unter 1. genannte Verfahren stellt in konstruktiv-apparativer Hinsicht einen größeren Aufwand dar. Es hat aber den Vorteil, daß die damit erzielbaren Meßgenauigkeiten im allgemeinen besser liegen als beim 2. und 3. Verfahren. Man darf nämlich nicht ohne weiteres voraussetzen, daß das Gesichtsfeld eines Mikroskopes genügend gleichmäßig ausgeleuchtet ist, um einen konstanten 100proz. Durchlässigkeitswert bzw. einen konstanten Extinktionsausgangswert ($E = 0$) über die ganze Fläche zu garantieren. Fehler, die durch diese zwangsläufigen Unzulänglichkeiten aller Optiken entstehen können, fallen im Fall 1 deshalb nicht ins Gewicht, weil stets an ein und derselben Stelle der Optik bzw. des Gesichtsfeldes gemessen wird.

Das Plug-Meßverfahren

Bei den eben dargestellten relativ genauen Abraster-Verfahren (z. B. Scanning-Verfahren) hatten wir wegen der unterschiedlichen Dicken des mikroskopischen Objektes gefordert, daß das Objekt in einzelne kleine Volumina bzw. zugehörige projizierte Meßflächen Δf aufgeteilt wird, um unerwünschte Einflüsse dieser Dicken- und Stoffverteilungsunterschiede auf das Meßergebnis klein zu halten. Es gibt nun ein sogenanntes (Einzel-)Plug-Meßverfahren (nicht zu verwechseln mit

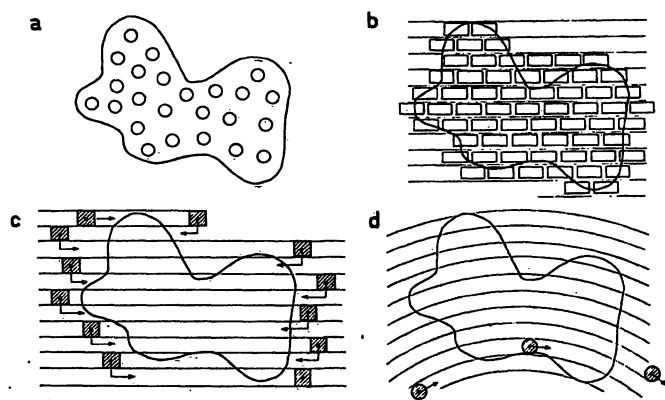


Abb. 2

- Möglichkeiten für das Abrastern eines mikroskopischen Objektes:
- a) statistisches Einflächenmeßverfahren (multiple Plug-Meßverfahren, d. h. Springen des Strahlenbündels bzw. Meß„punktes“)
 - b) systematisches Fläche-an-Fläche-Verfahren (zeitliches Aneinander-setzen der Meßstrahlenbündel)
 - c) mäanderförmige kontinuierliche Messung (zeilenweises Abfahren des Präparates, scanning)
 - d) Messung mit Hilfe einer Nipkow-Scheibe (ähnlich wie c, jedoch nicht gerade Zeilen, alle Zellen in einer Richtung durchfahren)

²⁾ 1 pg (picogramm) = 10^{-12} g; 1 fg (femtogramm) = 10^{-15} g.

dem oben erwähnten multiple-plug-Meßverfahren), das sich bis zu einem gewissen Grade über diese Bedenken hinwegsetzt. Hierbei wird der Kern bzw. das mikroskopische Objekt auf einmal gemessen, und man bestimmt, fast unerlaubterweise, die mittlere Extinktion und damit die zugehörige Gesamtmasse der absorbierenden Substanz (Abb. 3). Es haben sich nun verschiedene Autoren mit den Fehlern auseinandergesetzt, die durch solche vereinfachte Verfahren entstehen können (8). Es hat sich bei diesen Untersuchungen herausgestellt, daß bei gleichartigen, d. h. etwa gleichgroßen und ähnlich geformten Tropfen bzw. bei nicht gar zu inhomogenen Zellen im Mittelteil der Zelle doch recht genaue Ergebnisse erzielt werden können, wenn man sich daran hält, die Randteile der Zelle mit größeren Dicken- und Stoffverteilungsunterschieden nicht in die Messung (in die Abgrenzung des „plugs“) mit eingehen zu lassen. Das ist möglich bei geeigneter Begrenzung des Meßstrahlenbündels auf den Mittelteil (Abb. 3).

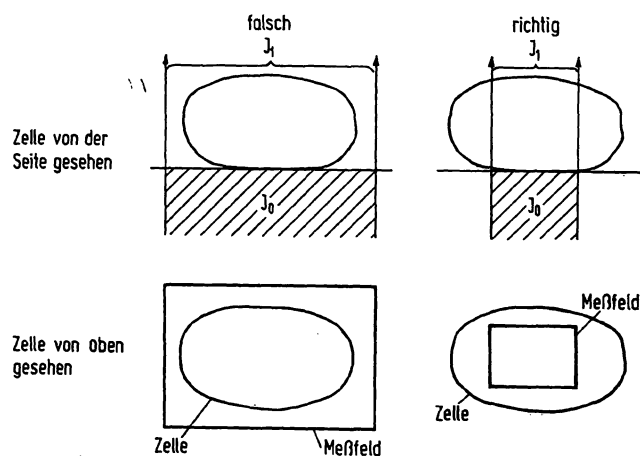


Abb. 3

Plug-Meßverfahren (schematisch), Linke 2 Darstellungen Meßbündel zu groß im Vergleich zum Mikroobjekt. Rechte 2 Darstellungen Meßbündel wesentlich kleiner als das Objekt (richtig)

Verfahren dieser Art haben den großen Vorzug, daß der apparative Aufwand wesentlich kleiner ist als bei den Abraster-Verfahren. Die Plug-Verfahren erfordern aber vom Untersucher höhere Kritik hinsichtlich der Auswahl des Meßbündeldurchmessers in bezug auf die Zellgröße. Weiterhin ist es schwierig, von dem gemessenen Teilvolumen auf das Gesamtvolumen zu extrapolieren. Man wendet daher vorzugsweise das Zweiwellenlängen-Meßverfahren zur Ausschaltung von Objektinhomogenitäten (s. S. 326) an.

Kleine Schichtdicke, großer Extinktionskoeffizient

Wenn man sich die eingangs beschriebenen Beziehungen des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes bzw. des für mikroskop-photometrische Untersuchungen umgeformten Gesetzes vor Augen hält, muß man an folgendes denken: Im Mikromaßstab wird bei Messungen an menschlichen Zellen mit Schichtdicken gearbeitet, die in der Größenordnung von 5–10 μm liegen werden. Im Makromaßstab wird meist mit 10 mm Schichtdicke gearbeitet, d. h.,

die Schichtdicke ist bei der Mikromethode um etwa einen Faktor 1000–2000 kleiner als im Makrobereich. Wenn wir jetzt gleiche Stoffe und gleiche Stoffkonzentrationen bzw. gleiche Extinktionskoeffizienten im Makro- bzw. im Mikrobereich voraussetzen, folgt daraus, daß im Mikromaßstab die gemessenen Extinktionen gut einen Faktor 1000 kleiner sind als normal. Das bedeutet aber weiter, daß die meisten Extinktionen im Mikromaßstab nicht mehr oder nur mit mäßiger Genauigkeit meßbar sind. Man kann also nur solche Stoffe ohne zusätzliche Anfärbeoperationen direkt in der biologischen Zelle bzw. im Mikroobjekt mit leidlicher Genauigkeit messen, die einen extrem hohen Extinktionskoeffizienten haben. Diese Bedingung erfüllen bei Zellen leider nur wenige Stoffe. Dazu gehören in erster Linie die Nucleinsäuren, ferner einige Proteinfractionen. Erwähnen kann man auch noch die Derivate des Hämoglobins, einige Pigmente und Atmungsfermente. Die Abbildung 4 zeigt den Verlauf des Extinktionskoeffizienten für einige dieser Substanzen. Wenn nicht die in den letzten Jahren im Blickpunkt des Interesses gestandenen Nucleinsäuren einbezogen wären, hätte die Mikroskop-Photometrie an ungefärbten Präparaten kaum die heute erlangte Bedeutung.

Wenn man nun über diese von Natur aus mit genügend hohen Extinktionskoeffizienten charakterisierten Substanzen hinaus weitere Substanzen in der Zelle bzw. im mikroskopischen Objekt messen will, dann muß man

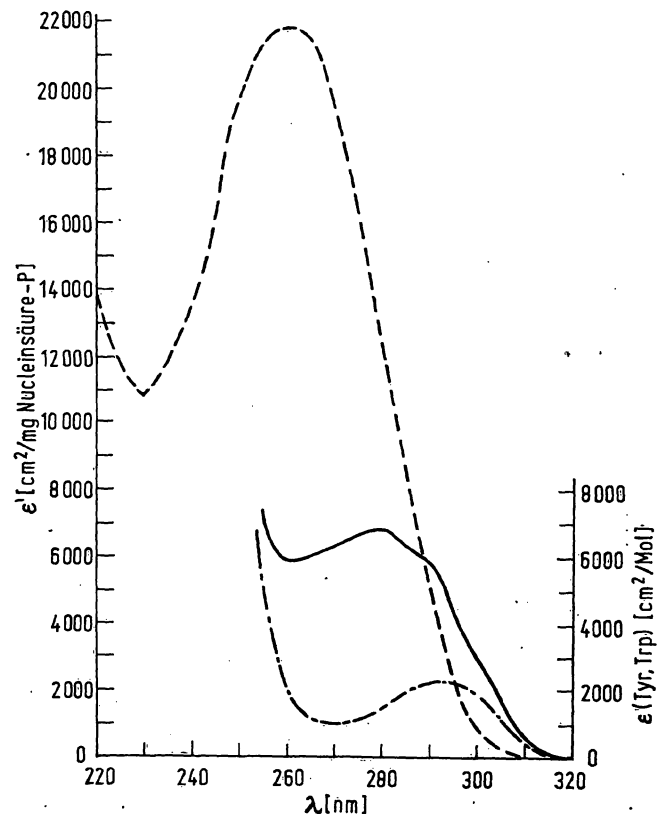


Abb. 4

Der spektrale Verlauf der Extinktionskoeffizienten einiger im UV-Bereich genügend stark absorbierender Stoffe. Die rechte Ordinaten-Teilung gilt für Tyrosin (---) und Tryptophan (—). Die linke Ordinaten-Teilung gilt für die Nucleinsäuren (---), für die man wegen der unterschiedlichen Molekulargewichte meist nur Relativwerte (bezogen auf Phosphor) angibt. (Nach SANDRITTER (5))



BEHRINGWERKE AG
MARBURG-LAHN

S. Behring

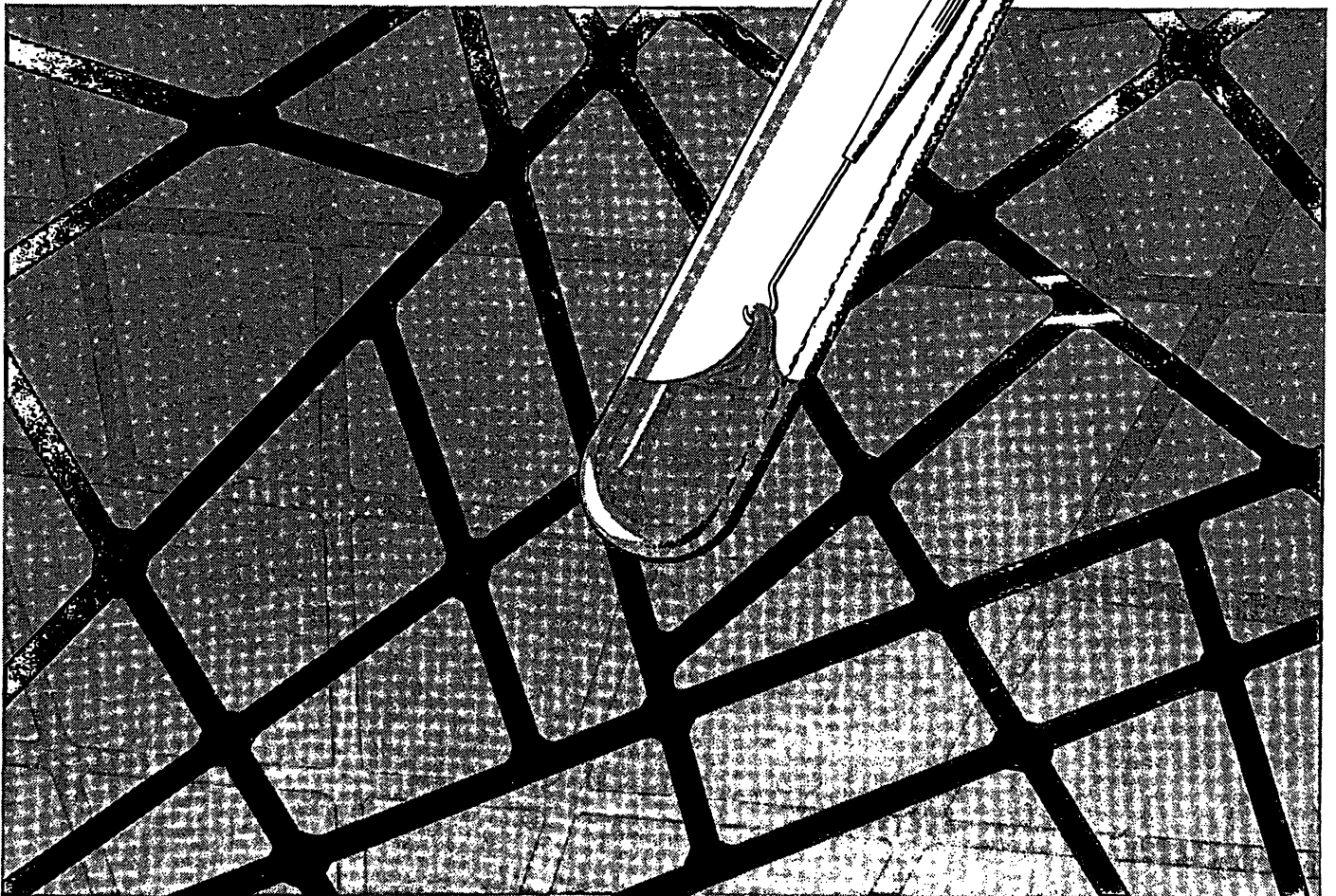
Calcium- Thromboplastin

Behringwerke

Für die Bestimmung der Einphasen-
Gerinnungszeit nach Quick

Eine Calcium-haltige
Thrombokinase
zur sicheren Überwachung
der Antikoagulantien-
therapie

B30129





GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE

Sigma ist die erste Firma, die kristalline Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase sowohl aus Bäcker- als auch Torula-Hefen herstellt. Bisher wurde Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nur aus Brauereihefe kristallisiert (Noltman u. Mitarb., J. biol. Chemistry 236, 1225 [1961]). Eine vergleichende Untersuchung dieser drei Enzyme dürfte sehr aufschlußreich sein. Alle drei Enzyme enthalten NADP und neigen bei hoher Ionenstärke zur Dissoziation in die Apoenzyme, wobei sie das

gebundene NADP abgeben. (Yue u. Mitarb., Biochemistry USA 6, 1174 [1967]). Das Enzym aus Torula ist nahezu stabil bei Raumtemperatur, sowohl als Suspension in wäßriger Lösung als auch als Trockenpulver. Unseres Wissens wurde das vorher nirgendwo erreicht. Sigma bietet jetzt die kompletteste Liste von Typen und Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase an, eingeschlossen höchste Reinheiten und Spezifitäten.

Vorläufige vergleichende Untersuchungen von Bäcker- und Torula-Hefe-Enzym ergaben:

1. Das Torulaenzym ist erstaunlich stabil;
2. Das Torulaenzym benötigt für maximale Aktivität etwa zweimal mehr Glucose-6-phosphat;
3. Beide Enzyme unterliegen der Hemmung durch Sulfationen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß;
4. Die Hemmung des Bäckerhefeenzymes kann aufgehoben werden durch Glucose-6-phosphat-Konzentrationen über 3 mM.

| Sulfat-konzentration | Torula G-6-PDH | Bäckerhefe G-6-PDH | Glucose-6-phosphat-Konzentration |
|----------------------|----------------|--------------------|----------------------------------|
| 1 mM | 20% Hemmung | 6% Hemmung | 0,1 mM |
| 10 mM | 80% Hemmung | 50% Hemmung | 0,1 mM |
| 100 mM | 99% Hemmung | 93% Hemmung | 0,1 mM |

Wir haben zu unseren Kristallsuspensionen (Typ VII und XI) 3 Mol NADP Mol Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase hinzugefügt, um bei der hohen Ionenstärke von 70% gesättigtem Ammoniumsulfat eine Dissoziation in die Apoenzyme zu verhindern. Außerdem bieten wir sulfatfreie Präparate (Typ XII und XV) aus beiden Hefestämmen an. Beide sind lyophilisierte Pulver (15% Salze, 85% Protein) und enthalten das Enzym teils als Apoenzym, teils als NADP-Enzym. Sie enthalten kein zugesetztes NADP und sind deshalb sehr geeignet für Untersuchungen mit der „Recycling“-Technik.

Wenn hohe Stabilität erforderlich ist und niedrige Sulfatkonzentrationen ausreichen, benutzt man das Torula-Hefe-Enzym. Bestehen höhere Sulfat- und sehr geringe Glucose-6-phosphat-Konzentrationen, benutzt man Bäckerhefeenzym.

Definition der Einheit: Eine Einheit oxydiert ein μ Mol Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconat pro Minute in Gegenwart von NADP bei pH 7,4 und 25°.

| Bestell-Nr. | Typ V aus Bäckerhefe | 100 U | \$ 5,00 | Bestell-Nr. | Typ XI aus Torula-Hefe | 150 U | \$ 7,50 |
|-------------|--|--|---------|-------------|---|------------------|---------|
| G 7750 | Unser altes trockenes Sulfat-Pellet unterliegt der Sulfathemmung (vergleiche oben) | 250 U | 10,00 | G 8878 | Kristallsuspension in 2,6 M Ammonium-Sulfat | 250 U | 10,00 |
| | Aktivität: nicht weniger als 150 U/mg Protein; sehr geringe oder keine Verunreinigung durch Hexokinase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase | 500 U | 17,00 | | Aktivität: etwa 300–400 U/mg Protein; sehr geringe oder keine Verunreinigung durch 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Hexokinase, Myokinase, Phosphoglucomutase, Phosphohexoseisomerase und NADP-Oxydase. Sehr stabil bei Raumtemperatur; Sulfathemmung vergleiche oben. Dieses Präparat ist sparsamer als das vergleichbare aus Bäckerhefe, ausgenommen für Systeme mit geringen Substratkonzentrationen | 500 U | 17,00 |
| | | 1000 U | 28,50 | | | 1000 U | 28,50 |
| | | 2000 U | 46,25 | | | 2000 U | 46,25 |
| | | | | | | 5000 U | 110,00 |
| Bestell-Nr. | Typ VII aus Bäckerhefe | 150 U | \$ 9,50 | Bestell-Nr. | Typ XII aus Torula-Hefe | 150 U | \$ 7,50 |
| G 7877 | Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfat | 250 U | 12,50 | G 7878 | Kristallisiert und lyophilisiert | 250 U | 10,00 |
| | Aktivität: 300–400 U/mg Protein | 500 U | 21,25 | | Aktivität: etwa 200–300 U/mg Protein. Sulfatfrei, Chargen enthalten augenblicklich etwa 5% Magnesiumacetat und 10% Ammoniumacetat. Wir hoffen, das Präparat in nächster Zukunft Ammoniumfrei anbieten zu können; sehr stabil bei Raumtemperatur, sogar nach Auffüllen mit Wasser oder Puffer, sofern frei von Bakterien | 500 U | 17,00 |
| | Sulfathemmung vergleiche oben | 1000 U | 35,50 | | | 1000 U | 28,50 |
| | | 2000 U | 57,75 | | | 2000 U | 46,25 |
| | | 5000 U | 147,50 | | | 5000 U | 110,00 |
| Bestell-Nr. | Typ XV aus Bäckerhefe | Ampullen, lyophilisiert, bereits gemessene Aktivität | | Bestell-Nr. | Typ XX aus Leuconostoc mesenteroides | Aktivität (NADP) | |
| G 6378 | Kristallisiert und lyophilisiert, sulfatfrei | 100 U | \$ 6,25 | G 7254 | Kristallisiert, entsalzt und lyophilisiert. Spezifisch für NAD und NADP | 100 U | \$ 7,25 |
| | Aktivität: etwa 200–400 U/mg Protein enthält etwa 15% Magnesiumacetat; dies ist wahrscheinlich das erste Angebot kristalliner Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Bäckerhefe; das Enzym kann in reinem Wasser oder Puffer gelöst werden | 250 U | 12,50 | | (NAD/NADP-Rate etwa 2/1) | 250 U | 14,50 |
| | | 500 U | 21,25 | | Aktivität: etwa 150 U/mg Protein (NADP) | 1000 U | 53,50 |
| | | 1000 U | 35,50 | | 300 U/mg Protein (NAD) | 2500 U | 107,00 |
| | | 2000 U | 57,75 | | Achtung: Bei pH 7,8 und 30° kann man eine etwa 50% höhere Aktivität erwarten | | |
| | | 5000 U | 147,50 | | | | |
| Bestell-Nr. | Typ XX aus Leuconostoc mesenteroides | Aktivität (NADP) | | Bestell-Nr. | Reinheitsgrad III. Rohes Pulver aus Hefe | 30 U | \$ 3,60 |
| G 7254 | Kristallisiert, entsalzt und lyophilisiert. Spezifisch für NAD und NADP | 100 U | \$ 7,25 | G 1878 | Aktivität: etwa 0,3–1,0 U/mg | 300 U | 30,00 |
| | (NAD/NADP-Rate etwa 2/1) | 250 U | 14,50 | | enthält gewöhnlich Hexokinase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase | 1000 U | 75,00 |
| | Aktivität: etwa 150 U/mg Protein (NADP) | 1000 U | 53,50 | | | 5000 U | 300,00 |
| | 300 U/mg Protein (NAD) | 2500 U | 107,00 | | | | |

Sigma-Reagenzien sind in der ganzen Welt durch den Fachhandel oder direkt aus St. Louis beziehbar.

Telegramme: SIGMACHEM, St. Louis, Missouri
Die Forschungslaboratorien von

SIGMA CHEMICAL COMPANY

3500 DE KALB ST. · ST. LOUIS 63118, MO. · U.S.A.

MANUFACTURERS OF THE FINEST BIOCHEMICALS AVAILABLE

Vertretung in England:

SIGMA LONDON Chem. Co. Ltd.



12, Lettice St., London S. W. 6 ENG.



Telephone: RENown-5823 (Rückberechnung)

spezielle chemische Vorbereitungsreaktionen ablaufen lassen, die aus der zu untersuchenden biochemischen Verbindung mit unzureichender natürlicher Extinktion einen neuen Stoff mit genügend hohem Extinktionskoeffizienten durch z. B. histochemisches „Anfärben“ hervorbringen (Einbau von chromophoren Gruppen an schwach absorbierende Stoffe). Tabelle 1 zeigt eine Aufstellung der heute in der Mikroskop-Photometrie häufig benutzten Farbreaktionen.

Tab. 1

Für die Mikroskop-Photometrie verwendete histologische Färbefarbreaktionen

| Farbreaktion | Farbreaktionen Geeignet für | Maximale Extinktion nm |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Feulgen-Reaktion | DNA | 570 |
| Gallocyaninchromalaun | RNA + DNA | 575 |
| Millon-Reaktion | Tyrosin | 495 |
| Millon-Reaktion | Tyrosin und Tryptophan | 365 |
| Sakaguchi-Reaktion | Arginin | 510 |
| Fastgreen-Färbung | Histoneiweiß | 635 |
| Naphtholgelb-Färbung | Gesamtprotein | 435 |
| DMAB-Nitrit-Reaktion | Tryptophan | 590 |

| Extraktions- und Blockierungsverfahren | | |
|--|---|--|
| Farbreaktion | Extraktionsmittel | Geeignet für |
| Fastgreen | HCl oder H ₂ SO ₄ oder NaCl | Histoneiweiß bzw. säurelösliche Proteine |
| UV-Messung dir. Fastgreen | Ribonuclease Blockierung d. ε-Amino- Gruppen d. Lysins, dazu Nachfixierung i. Formalin | RNA Lysin-Anteil der Histone |

Hierbei ergeben sich einige zusätzliche Möglichkeiten. Leider ist es schwierig, diese chemischen bzw. enzymatischen Reaktionen so zu steuern, daß sie in allen Fällen, d. h. bei verschiedenem biochemischen Milieu, verschiedenem pH, verschiedener Fixierung, verschiedenen Präparaten mit verschiedenen Oberflächenstrukturen usw. jeweils gleiche Farbe bzw. Extinktion bei gleicher gesuchter Stoffkonzentration bzw. Stoffmenge ergeben. Diese Schwierigkeiten will ich nur andeuten, ohne auf sie näher einzugehen. Ich verweise dazu auf die Literatur (13). Darüber hinaus sei erwähnt, daß man durch geschickte Kombination der chemischen bzw. enzymatischen Reaktionen mit den vorgenannten Absorptionsverfahren zu spezifischeren Aussagen kommen kann. In diesem Zusammenhang sollte man auch erwähnen, daß es sogenannte Doppelfärbemethoden gibt, die sich in ihrer Farbstoffgebung bei geeigneter Technik gegenseitig nicht stören und den Nachweis zweier verschiedener chemischer Stoffe nebeneinander, z. B. DNA und RNA erlauben (14). So kann man z. B. die Kernsubstanzen, die im wesentlichen aus Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure bestehen, zwischen dem 1. und 2. Meßgang mit Ribonuclease behandeln, und damit — durch Ausnützung der Differenzen — zu spezifischeren Aussagen kommen. Meine prinzipiellen Bedenken bei Anwendung mikrochemischer Reaktionen auf Zellen gelten auch für solche Elutionen. Erwähnt seien chemische Extraktionen mit Säuren oder Blockierungsreaktionen zur (Teil-)Verhinderung einiger Reaktionen.

Gültigkeit des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes

Wie schon eingangs erwähnt, gilt das LAMBERT-BEERSche Gesetz normalerweise nur für kleine Konzentrationen etwa unter 100 mm. Im biologischen Gewebe liegen aber häufig sehr hohe Konzentrationen vor, z. B. von Nucleinsäuren im Zellkern. Wären die Konzentrationen nicht so hoch, könnte man kaum messen. Die Kernsubstanz besteht fast ausschließlich aus Nucleinsäure und Nucleoproteiden. Man muß daher die Frage stellen, ob das LAMBERT-BEERSche Gesetz unter diesen extremen Bedingungen noch gilt. Bei der Nucleinsäure ist dies mit Hilfe von synthetischen Reinstpräparaten im Modellversuch von SVENSSON bewiesen worden (15).

Es bleibt allerdings die Frage offen, ob dieser Modellversuch unbedingt auf jede Art von Nucleinsäuren mit jeweils anderen biologischen Beimengungen übertragen werden darf. Auch die unterschiedlichen Probenvorbereitungen, z. B. Fixierungsverfahren, sollten in diese Betrachtungen einbezogen werden. Weiter ist zu sagen, daß entsprechende Untersuchungen für die in der Tabelle 1 gezeigten Farbstoffe noch nicht systematisch durchgeführt worden sind. Hier kann man Abweichungen vom LAMBERT-BEERSchen Gesetz bei den vorkommenden hohen Konzentrationen und dem extremen Milieu vermuten. Es sind eine Reihe von systematischen Vergleichsversuchen zwischen der Nucleinsäurekonzentration, gemessen ohne UV-Anfärbung auf der Nucleinsäure-Absorptionsbande bei 260 nm einerseits und dem Nucleinsäuregehalt, bestimmt mit Feulgenanfärbung und gemessen im sichtbaren Bereich andererseits, durchgeführt worden (10, 16). Bei solchen Vergleichsversuchen haben sich meist nur mäßige Korrelationen zwischen den mit beiden Methoden gefundenen Ergebnissen herausgestellt. Die Abweichungen bzw. die mäßigen Korrelationen hat man bis jetzt meist auf die unterschiedlichen Farbstoffbindungskapazitäten des unterschiedlichen biologischen Materials zurückgeführt (13). Wir sind der Ansicht, daß solche Fehlerursachen sicher nicht von der Hand zu weisen sind und noch weiterer systematischer Untersuchungen bedürfen. Auf der anderen Seite besteht aber durchaus die Möglichkeit, daß diese Abweichungen teilweise oder ganz auf Abweichungen vom LAMBERT-BEERSchen Gesetz sowohl auf der einen wie auf der anderen Seite bei solchen Vergleichsversuchen zurückgeführt werden können. Die bis jetzt meist biologisch geführten „Beweise“ für das gute Arbeiten der einen oder anderen Methode können wir nicht als strenge naturwissenschaftliche Beweise akzeptieren.

Zwei-Wellenlängen-Verfahren für die Ermittlung zweier Komponenten

Der Einfachheit halber wurden die Absorptionsmethoden hier so dargestellt, als ob immer nur *eine* absorbierende Substanz an der Meßwertbildung beteiligt sei. Tatsächlich wird man es in der Praxis meist mit *zwei* oder gar *mehreren* absorbierenden Substanzen gleichzeitig zu tun haben, und die Absorptionen dieser ver-

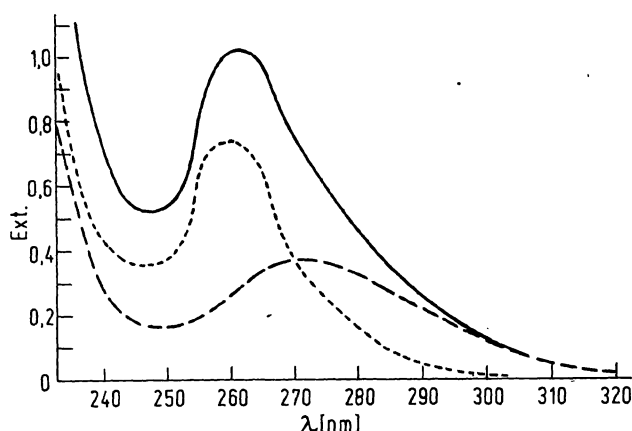


Abb. 5

Die Überlagerung zweier Absorptionen (schematisch). Die-Kurve stellt eine Nucleinsäureabsorption dar, die ---- Kurve eine Proteinabsorption. Nucleinsäureabsorption (.....) und Proteinabsorption (----) addieren sich zum Summenspektrum (—)

schiedenen Substanzen werden sich überlagern. Die Abbildung 5 zeigt ein Beispiel für ein Zweistoffgemisch A und B:

Für die folgende Überlegung wollen wir der Einfachheit halber zunächst voraussetzen, daß nur zwei absorbierende Substanzen A und B gleichzeitig beteiligt sind, die im untersuchten Tropfen bzw. der Zelle die Massen M_A bzw. M_B haben sollen. Inhomogenitätseinflüsse sollen — im Gegensatz zum folgenden Abschnitt — nicht stören. Wir wollen weiter voraussetzen, daß es mit der gegebenen Apparatur möglich ist, an zwei geeigneten ausgewählten Stellen (vgl. Abb. 5) des Spektrums λ_1 und λ_2 zu messen und weiter sei vorausgesetzt, daß die zweimal zwei Extinktionskoeffizienten ε_{A1} , ε_{B1} , ε_{A2} , ε_{B2} ebenfalls bekannt sind (Index A bzw. B bezieht sich auf die Substanz, Index 1 bzw. 2 bezieht sich auf die Wellenlänge). Unter diesen Voraussetzungen kann man ein Gleichungssystem mit den zwei Unbekannten M_A und M_B wie folgt aufstellen:

$$\sum E_1 \Delta f = \varepsilon_{A1} \cdot M_A + \varepsilon_{B1} \cdot M_B$$

$$\sum E_2 \Delta f = \varepsilon_{A2} \cdot M_A + \varepsilon_{B2} \cdot M_B$$

Die Auflösung dieses Gleichungssystems in der Determinanten-Schreibweise gibt:

$$M_A = \frac{\begin{vmatrix} \sum E_1 \Delta f & \varepsilon_{B1} \\ \sum E_2 \Delta f & \varepsilon_{B2} \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} \varepsilon_{A1} & \varepsilon_{B1} \\ \varepsilon_{A2} & \varepsilon_{B2} \end{vmatrix}}$$

bzw.:

$$M_B = \frac{\begin{vmatrix} \sum E_1 \Delta f & \varepsilon_{A1} \\ \sum E_2 \Delta f & \varepsilon_{A2} \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} \varepsilon_{A1} & \varepsilon_{B1} \\ \varepsilon_{A2} & \varepsilon_{B2} \end{vmatrix}}$$

Entsprechende Gleichungssysteme lassen sich auch für 3 und mehr absorbierende Substanzen aufstellen, sofern man an 3 bzw. mehreren verschiedenen Wellenlängen die unterschiedlichen Absorptionen messen kann und die zugehörigen Extinktionskoeffizienten kennt. Der Rekord an so bestimmten sich überlagernden Absorp-

tionsbanden liegt derzeit u. W. bei 15 Stoffen im Serum, allerdings ausgeführt im Makrobereich (17). Für die Mikroskop-Photometrie haben diese Verfahren folgende Bedeutung:

a) Man kann sich gegenseitig überlagernde Absorptionen z. B. von Nucleinsäure und Protein voneinander abziehen und auf den reinen Nucleinsäuregehalt bzw. Proteingehalt zurückrechnen. Entsprechendes gilt auch für sich überlagernde Absorptionen nach Anwendung von Doppelfärbemethoden (s. u.).

b) Man kann unspezifische aber trotzdem wellenlängenabhängige Einflüsse, z. B. die noch zu besprechenden Streulichteinflüsse, mit dieser Mehrwellenlängenmethode unter gewissen Voraussetzungen rechnerisch eliminieren, da sich diese wie eine Pseudo-Absorption verhalten (s. u.).

Zwei-Wellenlängen-Verfahren zur Ausschaltung von Fehlern durch Objekthinomogenitäten

In den vorangegangenen Abschnitten wurde vorausgesetzt, daß Meßfehler durch inhomogene Stoffverteilungsunterschiede in den Zellen bzw. durch Schichtdickenunterschiede dadurch vermieden werden, daß mit möglichst kleinen Meßflächen absuchend oder punktwise gemessen wird. Wenn die Inhomogenitäten aber kleiner sind als die Meßfläche, dann müßte man theoretisch zu noch kleineren Meßflächen übergehen, um solche Fehler auszuschalten. Das ist aber häufig aus apparativen oder prinzipiellen Gründen (s. o.) nicht möglich. Dann können durch solche Inhomogenitäten im Meßfeld erhebliche Fehler entstehen, die bis zu 70% des eigentlichen Meßwertes betragen können (18). Man kann dann den Absorptionsmeßfehler dadurch eliminieren, daß man das Absorptions- bzw. Pseudo-Absorptionsverhalten an zwei verschiedenen Wellenlängen mißt und aus dem verschiedenen Wellenlängen-Verhalten dieser beiden Komponenten Rückschlüsse auf die Größe des Inhomogenitätsfehlers an der eigentlichen Meßstelle zieht (18, 19, 20) und entsprechend korrigiert. Bei diesen speziellen Zweiwellenlängenmeßverfahren müssen wir aber voraussetzen, daß tatsächlich nur der eine zu messende Stoff zur Absorption beiträgt, was z. B. bei Anfärbemethoden im sichtbaren Spektralbereich (Doppelfärbungen ausgeschlossen) gut erfüllt ist. Anders ausgedrückt: Es dürfen bei Anwendung dieser Methode nicht etwa überlappende Absorptionen von zwei Stoffen A und B (s. Abb. 5) vorhanden sein. Einzelheiten hinsichtlich der zweckmäßigen Ausführung dieses Verfahrens entnehme man der zitierten Literatur.

Fehlermöglichkeiten durch Streuung, Beugung, Brechung und Reflexion

Von einigen Meßschwierigkeiten im Mikrobereich und von Möglichkeiten zu ihrer Beseitigung wurde oben schon gesprochen. Es ist schwer, im Rahmen dieses Überblickreferates einen Gesamtüberblick über alle möglichen Störungen und ihre Beseitigungsmöglichkeiten zu geben. Auf zwei weitere uns wesentlich erschei-

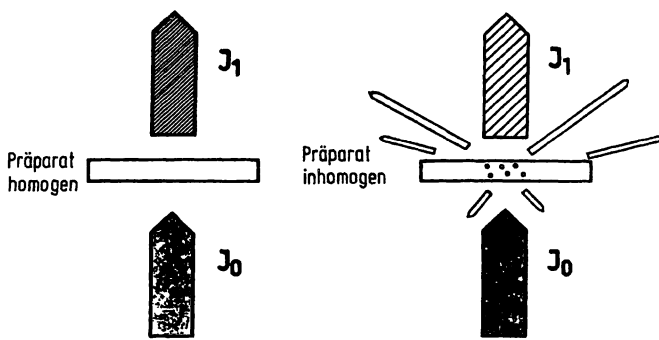


Abb. 6

Strahlungsverluste des ankommenden Meßstrahlenbündels I_0 im Präparat durch Streuung, Beugung, Brechung und Reflexion (schematisch). Links keine solchen Verluste. Rechts mit Verlusten dieser Art. Da I_1 in der rechten Darstellung schwächer ist, ergibt sich eine zusätzliche Pseudo-Absorption. Die Kontrast-Minderung der Streustrahlung von außen (Absorptions-Abschwächung) ist nicht mit dargestellt.

nende Fehlerquellen und ihre Vermeidung möchten wir aber hier hinweisen: Abgesehen von der unterschiedlichen Schichtdicke der Zelle und abgesehen von der inhomogenen Stoffverteilung innerhalb der Zelle und abgesehen von Fokussierungsfehlern ist noch zu berücksichtigen, daß streuende (unter Streuung wollen wir im folgenden auch Strahlenablenkung durch Beugung und Reflexion verstehen) Partikel im auszumessenden Volumen bzw. Partikel, die zufällig oberhalb oder unterhalb und auch außerhalb des Volumens vom Meßstrahlenbündel bestrahlt werden, die empfangene Strahlung mehr oder weniger seitlich ablenken können. Das kann einerseits zusätzliche Pseudo-Absorptionen vortäuschen, weil Strahlung in der Meßrichtung verloren geht. Diese Pseudo-Absorptionen haben mit der zu messenden Absorption nichts zu tun (Abb. 6).

Andererseits können von den Randpartien Streustrahlungen einfallen, die die Absorption im Meßstrahlenbündel scheinbar vermindern (Kontrastminderung). Bei der oben genannten Mehrwellenlängenmethode besteht die Notwendigkeit, gewissermaßen die Pseudo-Extinktionskoeffizienten dieser Pseudo-Absorptionen, herrührend von diesen Effekten, zu ermitteln. Darin besteht eine prinzipielle Schwierigkeit, weil man das kompliziert zusammengesetzte biologische Präparat nicht aus seinen Einzelteilen unter jeweiliger Beobachtung zusammenbauen kann. Man weiß zwar, daß diese Streustrahlung mit kürzer werdender Wellenlänge zunehmen muß. Für gewisse mathematisch definierte Partikelgrößen bzw. Formen und Brechzahlunterschiede läßt sich das Streuverhalten theoretisch berechnen bzw. aus absorptionsfreien Wellenlängenbereichen extrapolieren (21, 22). Man kann das sogar dazu ausnützen, um aus dem Streuverhalten Rückschlüsse auf Form und Größe der Partikel abzuleiten (23). Beim kompliziert zusammengesetzten biologischen Objekt besteht aber die grundsätzliche Schwierigkeit, daß man mit diesen mathematischen Modellen wenig anfangen kann, weil man es in der Praxis nur selten mit homogenen Partikelgrößen und Partikelformen, ja meist noch nicht einmal mit einheitlichen Brechzahlenunterschieden zu tun haben wird, und diese Parameter sind dazu noch von Präparat zu Prä-

parat verschieden. Unerwünschte Einflüsse dieser Art auf das Meßergebnis lassen sich aber meist durch eine geeignete Präparationstechnik einerseits und durch eine geeignete mikroskopische Beleuchtungstechnik andererseits klein halten. Als Streulicht verkleinernde Präparationstechnik sei die von CASPERSSON (2, 24) empfohlene Gefriertrocknung und Einbringung des Materials in ein UV-durchlässiges Medium mit relativ hoher, der Gewebesubstanz angepaßter Brechzahl, z. B. Glycerin, genannt. Als geeignete Beleuchtungs- und Beobachtungstechnik sei die ebenfalls auf CASPERSSON (1, 25) zurückgehende Empfehlung wiedergegeben, mit einer kleinen Kondensorapertur von etwa 0,2—0,3 bei kleiner Leuchtfeldblende zu arbeiten, auf der anderen Seite die Beobachtungapertur aber möglichst groß, z. B. bei 1,0, zu wählen (Abb. 7). Beim Messen (nicht beim Einstellen des Präparates) sollte man die Leuchtfeldblende auf die Größe des tatsächlich genutzten Meßstrahlenbündels zusammenziehen.

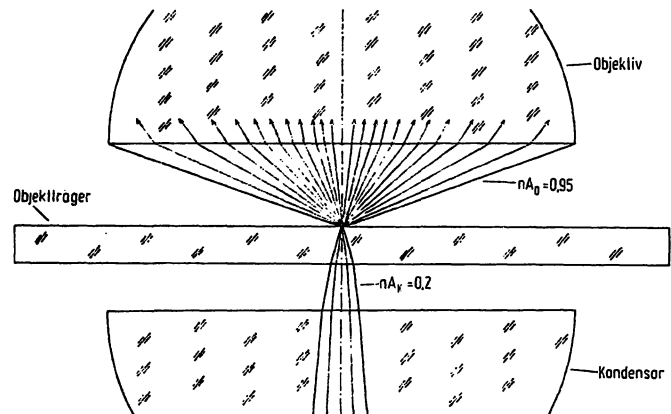


Abb. 7

Die für die Mikroskop-Photometrie empfohlene mikroskopische Beleuchtungs- und Beobachtungsmethode. Beim Vorliegen von sphärischen Partikeln kann man unter Umständen mit der Beleuchtungsapertur weiter heraufgehen

Eichverfahren

Im Prinzip kann man bei Kenntnis der Extinktionskoeffizienten aus den gemessenen Extinktionen mit den bereits gezeigten Gleichungen direkt auf die gesuchte Masse des absorbierenden Stoffes in der Zelle, im Tropfen usw. zurückschließen. Auf Absolut-Verfahren dieser Art kann man sich nur selten verlassen, da die angedeuteten Fehlermöglichkeiten sowie einige weitere schwer übersehbare absolute Fehler hervorrufen können. Man wird daher meist Relativverfahren bevorzugen, d. h. Verfahren, bei denen der Meßwert nicht absolut, sondern relativ in bezug auf ein unter gleicher Bedingung untersuchtes Vergleichspräparat gewonnen wird. Eingebürgert hat sich das Verfahren mit den Arbeitseinheiten (AE) als relative Meßgröße (13, 26, 27). So verwendet man z. B. bei der Untersuchung von menschlichen Spermien gern Bullenspermien, die man u. U. im Präparat zu den menschlichen Spermien zugibt (28). Diese eignen sich als „Eichstandard“ deswegen, weil die biologische Streubreite ihres Nucleinsäuregehaltes usw. recht klein, also fast konstant ist. Der Nachteil mancher Eichpräparate besteht nur darin, daß man mit der Ver-

gleichsmessung an einer *einzelnen* Zelle in einem solchen Präparat nicht genügend Informationen hat, sondern man ist gezwungen, einen statistischen Mittelwert über eine größere Zahl von Zellen zu ermitteln.

SERNETZ und THAER haben ein von ihnen für die Fluoreszenzanalyse entwickeltes interessantes und recht genaues Eichverfahren vorgestellt (29). Wir sind davon überzeugt, daß sich dieses elegante Eichverfahren auch auf die hier besprochenen Absorptionsanalysen übertragen läßt, wenn man in geeigneter Weise vorgeht.

Apparative Ausstattung

In den Anfangszeiten der Mikroskop-Photometrie war man gezwungen, mit selbst gebauten Mikroskop-Photometern zu arbeiten. Auch wir haben uns einige Zeit in dieser Richtung betätigt (30). Inzwischen hat sich die optische Industrie dieses speziellen apparativen Problems angenommen, und es stehen jetzt eine gewisse Anzahl von handelsüblichen Ausrüstungen für fast jeden Anwendungsfall zur Verfügung. Zur Auswahl solcher Geräte möchte ich folgendes sagen: Je mehr Bedienungskomfort bei der Durchführung von Messungen gefordert wird, desto höher werden im allgemeinen die Anschaffungskosten sein. Dieser durch die Automatisierung und die Computer-Technik bedingte Mehraufwand lohnt sich naturgemäß nur dann, wenn anschließend entsprechende Stückzahlen untersucht werden müssen. Ich persönlich stehe daher auf dem Standpunkt, daß ein geschickter und kritischer Experimentator auch mit

relativ einfachen Mitteln in diskutabler Zeit zu durchaus brauchbaren Ergebnissen kommen kann, vorausgesetzt, daß man ihn nicht gerade mit großen Meßreihen überschüttet.

Ausblick

Die Mikroskop-Absorptionsverfahren im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich haben durch die Fluoreszenzanalysen an mikroskopischen Präparaten einen ernsthaften Konkurrenten bekommen. Ich glaube aber kaum, daß es den Fluoreszenz-Verfahren gelingen wird, die Absorptionsmethoden völlig zu verdrängen. Es kommt nur darauf an, die Vor- und Nachteile beider Methoden zu erkennen und im Einzelfall für einen bestimmten Anwendungsfall die optimale Methode auszuwählen. Was die Absorptionsmethoden allein anbelangt, so glauben wir, daß sich im Laufe der Zeit weitere Anwendungsmöglichkeiten durch die Erschließung weiterer im kurzwelligen UV liegender (nativ-)Absorptionen und durch neue Anfärbemethoden eröffnen werden und daß man die bis jetzt nicht immer voll befriedigenden Ergebnisse nach solchen Anfärbungen im Laufe der nächsten Zeit besser in den Griff bekommen wird, wenn es gelingt, die bei den Anfärbemethoden auftretenden Unregelmäßigkeiten besser zu verstehen und damit reproduzierbarer zu arbeiten. Auch werden die physikalisch-technischen Fortschritte bei der Entwicklung einfacherer und noch leistungsfähigerer, meist automatischer Hilfsmittel dieser Absorptions-Methode weitere Freunde zuführen.

Literatur

1. CASPERSSON, T., Scand. Arch. Physiol. Suppl. Nr. 8 (1936). —
2. CASPERSSON, T., Cell Growth and Cell Function, W. W. Norton & Comp., New York (1950). — 3. KORTÜM, G., Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie, 4. Aufl., Springer-Verlag (1962). — 4. HERRMANN, R., Ber. Orig. Hanau Quarz. GmbH, 1, 45 (1967). — 5. SANDRITTER, W., in: Graumann: Handb. d. Histochemie, Bd. 1, S. 220, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1958). — 6. HANSEN, G., Zeiss Mitteilungen 2, 4 (1961). — 7. TRAPP, L., in: Internat. Symp. klin. Cytodiagnostik, Erlangen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1958). — 8. LEUCHTENBERGER, C., in: J. F. Danielli, General Cytochemical Methods. Acad. Press, New York, S. 219 (1958). — 9. BARTELS, P. H., in: G. L. Wied, Introduction to Quantitative Cytochemistry, Academic Press, New York (1966). — 10. MEYHÖFER, W., Arch. klin. exper. Derm. 216, 556 (1963). — 11. MONTGOMERY, P. O'B., Ann. N. Y. Acad. Sc. 97, 329 (1962). — 12. LANG, W., Optik 23, 214 und 235 (1965). — 13. NOESKE, K., Die Zusammensetzung der Zellkernproteine und ihre Beziehung zum DNS-Gehalt ..., Habil.-Arb. Gießen (1968). — 14. KIEFER, G., W. ZELLER und W. SANDRITTER, Histochemie 20, 1 (1969). — 15. SVENSSON, G., Microchim. Acta 1956, 645. — 16. NOESKE, K., Histochemie 20, 322 (1969). — 17. DAVIS, W., E. SCHONFELD und A. H. KIBBEY, Clin. Chem. New York 14, 310 (1968). — 18. MENDELSON, M. L., in: G. L. Wied, Introduction to quantitative Cytochemistry, Academic Press New York S. 201 (1966). — 19. ORNSTEIN, L., Lab. Invest. 1, 250 (1952). — 20. PATAU, K., Chromosoma 5, 341 (1952). — 21. BENEKE, G., Acta Histochemica Suppl. VI, 239 (1965). — 22. SCHAUENSTEIN, E. und W. KLÖPPER, Acta Histochem. Suppl. VI, 227 (1965). — 23. BURBERG, R., Acta Histochemica Suppl. VI, 223 (1965). — 24. HERRMANN, R., Zbl. allg. Path. 99, 73 (1959). — 25. CASPERSSON, T., J. Roy. Microscop. Soc. 60, 8 (1940). — 26. SANDRITTER, W. und G. KIEFER, Acta Histochem. Suppl. VI, 189 (1963). — 27. EHLERS, G., Arch. klin. exp. Derm. 224, 329 (1966) und G. EHLERS, Krebsforsch. Krebsbekämpf. 6, 121 (1967). — 28. RUCH, F., in: G. L. Wied, Introduction to Quantitative Cytochemistry, Acad. Press New York, S. 281 (1966). — 29. SERNETZ, M. und A. H. THAER, J. Microscopy 91, 1 (1970). — 30. HERRMANN, R., Acta Histochem. 7, 235 (1959).

Auf weitere Übersichtsartikel sei hier noch hingewiesen: BLOUT, E. R., „Microspectroscopy“ aus: A. Weissberger, Physical Methods of organic Chemistry. 2. Aufl. Bd. 1, 2179, New York (1954). — CLARK, G. L., The Encyclopedia of Microscopy, New York (1961). — GLICK, G., Quantitative Chemical Techniques of Histo- and Cytochemistry New York und London (1961 und 1963). — MELLORS, R. C., Analytical Cytology, New York (1955). — WIED, G. L., Introduction to Quantitative Cytochemistry, New York und London (1966).

Prof. Dr. R. Herrmann
63 Gießen
Gaffkystr. 14